

## Antioxidant Activities and Whitening Effects of a Mixture of the Eco-friendly Materials *Pinus koraiensis* and *Hibiscus cannabinus* L.

Min-Jeong Oh<sup>1</sup>, Hyeon-Ji Yeom<sup>1</sup>, Jung-Woo Chae<sup>2</sup> and Jin-Young Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Cosmetics Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea

<sup>2</sup>Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan 12408, Korea

Received October 6, 2020 / Revised January 29, 2021 / Accepted February 1, 2021

This study verified the antioxidant and whitening activities of a *Pinus koraiensis* extract (PK) and a *Hibiscus cannabinus* L. extract (HC), and further evaluated the interaction of the extract ingredients when mixed at a 1:1 ratio (PKHC). The electron-donating and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of the PKHC extract at 1,000 µg/ml concentration were 93.7% and 94%, respectively, indicating a higher efficacy than achieved with either extract alone. Measurements of the tyrosinase activities in response to PK, HC, and PKHC extracts at 1,000 µg/ml concentrations showed inhibitions of 40%, 27.5%, and 43%, respectively, confirming a higher efficacy of the mixture due to the synergistic action of the ingredients. The cell toxicity values in melanoma cells treated with PK, HC, and PKHC at 1,000 µg/ml concentration were 87.4%, 80.2%, and 98%, confirming a higher viability in cells treated with the mixture due to antagonism. The expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2), and tyrosinase protein expression determined by Western blotting decreased by 53.9%, 64.8%, 67.3%, and 56.1%, respectively, when PKHC was administered at a concentration of 100 µg/ml. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) results also showed that PKHC at a concentration of 100 µg/ml inhibited the mRNA expression of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase mRNA by 54.4%, 64.9%, 66.6%, and 63.1%, respectively. Taken together, the data confirmed the antioxidant and whitening effect of the PKHC extract and verified the possibility that this extract mixture has great potential as a cosmetic ingredient.

**Key words** : Antioxidant activities, *Hibiscus cannabinus* L. , mixture, *Pinus koraiensis*, whitening effect

### 서론

피부는 외부 환경으로부터 신체를 보호하는 역할을 하며, 생체적인 노화정도를 판단하는 지표가 된다. 피부노화는 내외적으로 복합적인 요인에 의해 일어나는데, 내적인 요인은 피부노화를 피할 수 없는 자연적인 규율이며 외적인 요인은 주로 자외선 및 기후 등의 환경적인 영향을 포함한다. 피부에 가장 큰 영향을 미치는 외적 요인인 자외선과 호흡을 통해 활성산소가 형성되고 이에 따라 활성산소종이 생성된다. 이러한 활성산소는 유해 산소라 불리며 미토콘드리아, 식세포 등에서 정상적인 대사 과정 중에 다른 분자와의 상호작용으로 짝짓지 않은 상태의 전자를 가진 산소분자를 말한다. 활성산소들은 높은 반응성과 파괴성을 가지고 있어 생체 내의 세포막, 단백질, DNA 등 여러 조직 및 피부세포에 기능적인 손상을

을 입힘으로써 암 및 동맥경화 등의 질병을 유발하고 피부의 노화를 가속화한다[4, 18].

자외선에 의한 광노화가 진행되면서 피부는 피부 세포손상에 대한 방어 작용으로 멜라닌 색소를 생성한다. 멜라닌은 피부에 존재하는 색소로서 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 하고 다양한 원인에 의해 생성 및 합성되며, 특히 자외선에 의해 생성이 촉진된다. 멜라닌의 과잉생성 및 피부 표피층에서의 축적으로 인해 주근깨, 기미 등의 피부질환 및 노화 촉진과 피부암 유발의 원인이 되기도 한다[6, 7].

멜라닌은 피부의 표피층에 있는 melanocyte에서 합성되며, 멜라닌의 생합성 과정에 작용하는 주요 효소는 tyrosinase이다. Tyrosinase는 tyrosine hydroxylase에 의하여 tyrosine으로부터 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)으로 전환하고 효소적 산화 반응에 의해 DOPA-quinone, DOPA-chrome으로 변환하여 멜라닌을 생합성 한다. 이 과정은 tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 효소의 작용으로 조절되며, TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)을 carboxylated indole-quinone으로 산화시키고 TRP-2는 DOPA-chrome tautomerase로 작용하여 DHICA로 전환한다[7, 8]. 또한 세포 내 주요한 신호전달 경로는 cyclic monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) 경

#### \*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552, Fax : +82-41-540-9538

E-mail : [jylee@hoseo.edu](mailto:jylee@hoseo.edu)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

로이며, cAMP는 PKA, cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)을 경유하여 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 촉진하며 MITF는 멜라닌 합성 과정에서 멜라닌세포의 성장 및 생성 작용에 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다[9].

잣나무(*Pinus koraiensis*)는 소나무과에 속하는 상록목으로 해발고도 1,000 m 이상에서 높이 30 m, 지름 1 m 정도까지 자라는 나무이다. 잣나무의 수피는 회갈색이고 목재는 심재가 연한 빨간색을 띠므로 홍송(紅松)이라고도 한다. 목재부분은 재질이 가볍고 질이 연하며 결이 곧게 뻗어 있어 가공이 용이하여 고급 건축 및 가구재, 도구나 선박을 만드는 데 사용된다[13].

소나무 재선충병은 한 번 감염될 경우 치료 회복이 불가능한 치명적인 산림병해충으로, 소나무 재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)이 소나무, 잣나무, 해송 등에 감염되면 단기간에 말라 죽게 한다. 이는 스스로 다른 나무로의 이동이 불가능하여 소나무 재선충이 감염목에 서식하고 있던 매개충의 몸속으로 들어가 새로운 나무로 이동하게 되면서 확산시키게 된다. 소나무 재선충이 침입하여 급속하게 증식된 나무는 송진 분비가 멈추고 휘발성 물질이 분비되며 수분과 양분의 흐름에 이상이 발생하여 죽게 된다. 경기도 지역은 특히 병의 발현속도가 느리고 재선충의 전파능력이 다소 낮은 잣나무의 소나무 재선충병의 피해가 발생되고 있다[17]. 소나무 재선충병 피해목은 현재 파쇄, 훈증 과정을 통해 고부가 목재 및 친환경 연료 등으로 활용되고 있으나, 매년 반복되는 피해로 인해 아직까지 소나무 재선충 피해목의 수집 및 활용율은 높지 않으며 이에 대한 연구가 필요한 실정이다[11].

케나프(*Hibiscus cannabinus* L.)는 아욱목 아욱과에 속하는 쌍떡잎 식물로 인도, 아프리카 등에서 자생하는 1년생 초본식물이다. '양마'라고도 불리는 케나프는 생장 속도가 빠르고 다양한 토질에서 생육이 가능하며, 상업적으로는 밧줄, 마대감 및 민간 의약품 등으로 이용되어 왔다. 최근에는 펄프, 친환경 바이오 소재 및 바이오 플라스틱 용품, 비목재 섬유작물로 많은 관심을 받고 있다. 특히 케나프 잎에 40%, 줄기에 10% 내외의 단백질이 다량 함유되어 있으며, 항산화 물질인 flavonoid 및 polyphenol과 비타민 C 및 철분 함량이 높아 화장품 소재로도 활용이 가능한 작물이다[14, 15].

현재 소나무 재선충 피해목인 잣나무의 목재 부분에 대한 수집 및 활용도에 대한 연구는 아직까지 미비한 편이며, 케나프의 잎에 대한 연구는 활발히 진행되고 있는 반면 줄기에 관한 연구는 부족한 실정이다. 또한 잣나무 목재와 케나프 줄기는 국내 재배가 가능한 친환경 소재로 2가지 모두 외피가 거칠고 뾰뾰한 단점이 있으나, flavonoid와 polyphenol이 다량 함유되어 있어 항산화 효능이 우수하다. 본 연구에서는 활용 가능한 친환경 소재인 잣나무 목재 추출물과 케나프 줄기

추출물을 이용하여 생리활성 및 미백 활성을 검증하고, 두 가지 추출물을 1:1의 비율로 혼합하였을 때 유효 성분들의 항산화 및 미백 효능에 대한 상승 및 길항 작용을 확인함으로써 이를 이용하여 추후 피부 연마제의 재료로서 활용과 기능성 화장품의 천연 소재로서 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시료 추출

본 실험에서 사용된 추출물은 경기도 지역의 재선충 피해목인 잣나무 목재(*Pinus koraiensis*, PK)와 케나프 줄기(*Hibiscus cannabinus* L., HC)를 사용하여 70% 에탄올 추출을 실시하였다. 잣나무 목재와 케나프 줄기를 각각 건조시킨 후 분쇄하여 70% 에탄올을 시료 중량의 10배로 가하여 상온에서 24시간 침지하였다. 상등액과 침전물을 분리시킨 후 추출하였으며, 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 사용하여 여과하였다. EYELA evaporator로 감압 농축을 실시하여 용매를 완전히 제거한 후 동결 건조하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 세포주

세포 배양 및 세포 독성 측정에 사용된 마우스 흑색 세포종인 B16F10는 ATCC (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해 사용한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), trypsin은 thermo scientific hyclone (USA)에서 구입하였다.

### 시약 및 기기

항산화능 및 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능 측정에 사용된 시약인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 potassium persulfate는 Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)는 Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 미백활성 측정 실험에 사용된 시약인 L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA)와 mushroom tyrosinase 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양 및 세포 생존율 측정에 사용된 haemocytometer (Marienfeld, Germany), 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Bio Shop (Canada)에서 구입하여 사용하였다. 또한 단백질 발현 실험에 사용된  $\beta$ -actin 및 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 primary antibody와 anti-mouse, anti-goat, anti-rabbit 등의 secondary antibody는 Santa Cruz (CA, USA)에서 구입하였

다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 이용한 cDNA polymerase kit, Go Script™ Reverse Transcription kits는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였으며, GAPDH 및 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase는 Bionics (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 vortex (Scientific Industries, INC, U.S.A.), microplate reader (Tecan, Austria), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), autoclave (JS Research Inc, Korea), freeze drier (ILShin BioBase Co. Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Vision Scientific, Korea), microscope (Olympus, Japan), micro centrifuge (gyrozen, Korea), digital shaker (Deihan Scientific, Korea), centrifuge (Hanil Science Industrial Co. Korea), Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad, U.S.A.), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, U.S.A.), Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co, Korea), PCR (C-100, Bio-Rad, USA)의 기기를 사용하였다.

## 실험 방법

### 전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법[1]을 변형하여 시행하였다. 에탄올에 용해한 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 60 µl와 농도 별로 조절한 시료용액 120 µl를 micro well plate에 넣고 혼합한 후 실온에서 15분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity assay 측정

ABTS<sup>+</sup> decolorization assay 방법[3]은 ABTS<sup>+</sup> radical을 이용한 항산화력 측정방법으로 7 mM 2,2-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) 및 2.45 mM potassium persulfate를 혼합한 후 실온에서 24시간 동안 반응하여 ABTS<sup>+</sup>를 형성시킨다. 이 후 에탄올로 희석하여 사용하였으며, ABTS<sup>+</sup> 100 µl에 시료 100 µl를 가하여 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[20]에 따라 실험을 진행하였다. 반응구는 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 µl에 10 mM L-DOPA (Sigma, USA)를 녹인 기질액 40 µl와 시료용액 40 µl의 혼합액에 200 U/ml mushroom

tyrosinase (Sigma, USA) 40 µl를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨다. 반응 후 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 세포 배양

본 실험에 이용한 멜라노마 세포인 B16F10의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

### MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[2]에 따라 실험을 진행하였다. 멜라노마 세포인 B16F10를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 180 µl씩 분주하였고, 시료를 농도별로 조절하여 20 µl씩 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 2.5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 40 µl를 첨가하여 3시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO 100 µl씩 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), tyrosinase의 미백관련 인자들의 활성을 알아보기 위하여 멜라노마 세포인 B16F10을 100 mm tissue culture dish에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 cell seeding한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거하고 α-MSH (100 nM)를 2시간 처리한 후 추출물을 농도 별로 처리한 배지로 24시간 배양하였다. 이후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척하였다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab를 가한 100 µl로 용해하여 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였으며, 20 µl의 단백질을 10% acryl amide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 후 실온에서 1시간 동안 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline

and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 90분간 배양한 후 TBST로 3회 세척하여 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

**Total RNA 분리 및 cDNA 합성**

B16F10 세포를 100 mm culture dish에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 cell seeding하여 24시간 동안 배양한 후 α-MSH (100 nM)를 2시간 처리해준 후 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1,000 µl씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200 µl를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어서 반응시켰다. 그 후 4℃, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl가 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였고, 그 상층액을 제거하여 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 각 튜브에 1,000 µl씩 분주하여 4℃, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 실온에서 건조하였다. DEPC를 처리한 증류수를 50 µl씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 용액 5 µl와 멸균수 195 µl를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl, 추출한 RNA (2 µg)와 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75℃에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix, RNasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25℃에서 5분, 42℃에서 60분, 70℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

**Reverse transcription-PCR**

MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 미백관련 인자들에 대한 mRNA 발현을 알아보기 위하여 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같으며 PCR tube에 5X green GoTaq flexi buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix (10

mM), primer, Go Taq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 혼합한 후 PCR을 실행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 96℃에서 10초, 64℃에서 30초, 72℃에서 1분(40 cycles), tyrosinase는 96℃에서 10초, 64℃에서 30초, 72℃에서 1분(40 cycles)을 실행하였다. MITF, TRP-1 및 TRP-2는 각각 96℃에서 10초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분(40 cycles)을 실행하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 30분 동안 전기영동 후 UV transilluminator를 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**전자공여능 측정 결과**

DPPH radical 소거 활성법은 가장 간편한 항산화 활성 측정방법 중의 하나로 항산화 활성 물질이 DPPH의 radical을 소거시켜 노란색으로 탈색되는 점을 이용하여 측정하는 방법이다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 free radical로서 짙은 자색을 띠고 비교적 안정적이며 황이 포함된 아미노산이나 ascorbic acid, butylated hydroxyanisole (BHA) 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다[10].

잣나무 목재(*Pinus koraiensis*, PK)와 케나프 줄기(*Hibiscus cannabinus* L., HC) 및 잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물을 1:1비율로 혼합한 추출물(PKHC)의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과 Fig. 1과 같이 나타났고, 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물은 각각 1,000 µg/ml에서 91.6%, 84.8%의 효과를 나타냈으며, PKHC는 94%의 가장 높은 전자공여능 활성을 보여 항산화 효능에 대한 잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물의 상승효과를 확인할 수 있었다.

**ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity assay 측정 결과**

ABTS<sup>+</sup> radical 소거능은 ABTS diammonium salt와 potas-

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5' →3')
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC

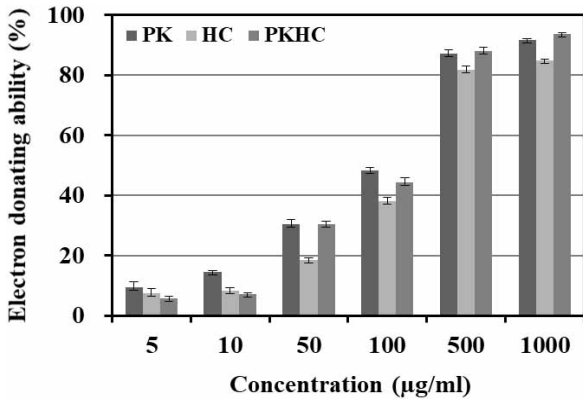


Fig. 1. Electron donating ability of extracts from *Pinus koraiensis*, *Hibiscus cannabinus* L. and the mixture. ■ PK : *Pinus koraiensis* extracted with 70% ethanol. □ HC : *Hibiscus cannabinus* L. extracted with 70% ethanol. ▣ PKHC : A mixture of *Pinus koraiensis* and *Hibiscus cannabinus* L. extract in a ratio of 1:1. Result are means ± SD. of triplicate data.

sium persulfate의 반응에 의해 생성된 cation (ABTS<sup>+</sup>)이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되면서 radical 특유의 색인 청록색에서 연한 녹색으로 탈색되는 것을 측정하는 방법이다 [12].

잣나무 목재, 케나프 줄기 및 혼합추출물의 ABTS 소거능 측정 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 추출물의 농도가 증가함에 따라 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물은 1,000 µg/ml에서 각각 91%, 98.8%의 라디칼 소거능을 나타내었다. 혼합추출물은 100 µg/ml에서 90% 이상의 소거능을 나타내었으며, 최고 농도인 1,000 µg/ml에서는 99%로 잣나무 목재와 유의한 효능을 확인할 수 있었다.

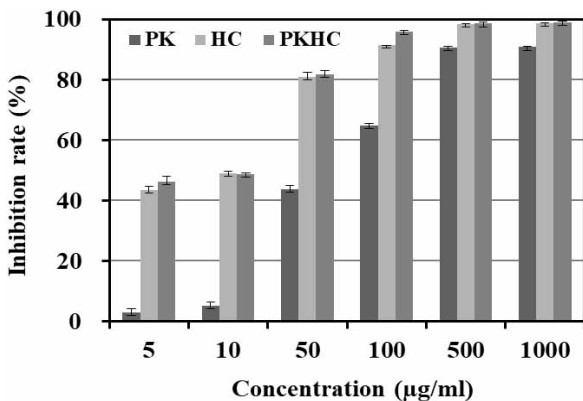


Fig. 2. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of *Pinus koraiensis*, *Hibiscus cannabinus* L. and the mixed extracts. ■ PK : *Pinus koraiensis* extracted with 70% ethanol. □ HC : *Hibiscus cannabinus* L. extracted with 70% ethanol. ▣ PKHC : A mixture of *Pinus koraiensis* and *Hibiscus cannabinus* L. extract in a ratio of 1:1. Result are means ± SD. of triplicate data.

### Tyrosinase 저해활성 측정 결과

멜라닌 합성은 tyrosinase의 일련의 효소 반응에 의해 조절되며, melanosome 내의 tyrosine을 산화시켜 DOPA, DOPA quinone으로 바꾸고, 이들은 효소의 작용 및 자동 산화반응에 의하여 DOPA chrome, indole carboxylic acid, indolequinone 등으로 대사되어 멜라닌 합성에 관여하게 된다. Tyrosinase 활성억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되고 있다[5, 16].

잣나무 목재(PK), 케나프 줄기(HC) 및 혼합 추출물(PKHC)의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물은 각각 1,000 µg/ml에서 40%, 27.5%의 저해활성을 나타낸 결과와 비교하였을 때, PKHC는 1,000 µg/ml 농도에서 43%의 결과로 미백 효능에 대한 상승효과를 확인할 수 있었다.

### MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과

세포 생존율을 측정하기 위한 MTT assay는 탈수소 효소작용으로 생성된 담황색 기질인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)이 미토콘드리아의 호흡연쇄에 의해 환원되어 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan을 생성하며, 죽은 세포에는 반응하지 않는 MTT formazan이 환원되는 정도를 측정하는 검사법이다[19].

잣나무 목재와 케나프 줄기 및 혼합추출물의 멜라노마(B16 F10) 세포에서의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 4과 같이 나타내었다. 잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물은 50 µg/ml 농도에서 95%에 가까운 세포 생존율을 확인할 수 있었으나, 혼합추출물은 100 µg/ml에서 100%에 이르는 세

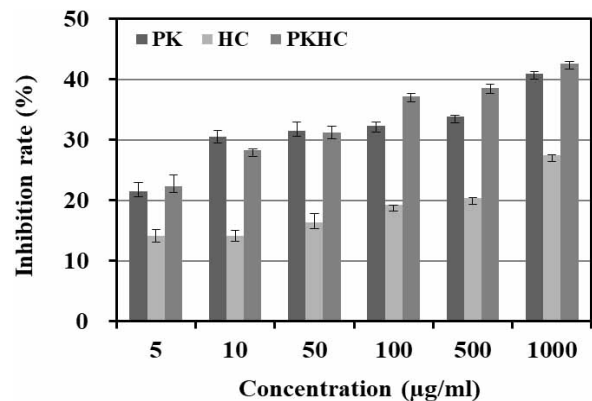


Fig. 3. Inhibition rate of *Pinus koraiensis*, *Hibiscus cannabinus* L. and the mixed extracts on tyrosinase. ■ PK : *Pinus koraiensis* extracted with 70% ethanol. □ HC : *Hibiscus cannabinus* L. extracted with 70% ethanol. ▣ PKHC : A mixture of *Pinus koraiensis* and *Hibiscus cannabinus* L. extract in a ratio of 1:1. Result are means ± SD. of triplicate data.

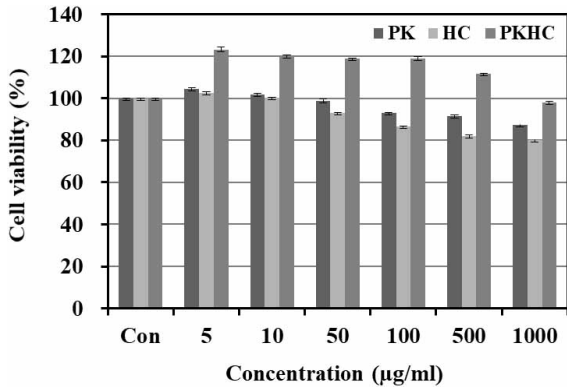


Fig. 4. Cell viability of extracts from *Pinus koraiensis*, *Hibiscus cannabinus* L. and the mixture on melanoma cell (B16 F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml of extracted PK, HC and PKHC for 24 hr. ■ PK : *Pinus koraiensis* extracted with 70% ethanol. □ HC : *Hibiscus cannabinus* L. extracted with 70% ethanol. ▒ PKHC : A mixture of *Pinus koraiensis* and *Hibiscus cannabinus* L. extract in a ratio of 1:1. Result are means ± SD. of triplicate data.

포 생존율을 나타내었다. 잣나무 목재, 케나프 줄기 추출물과 혼합추출물의 세포 생존율 측정 결과를 비교하였을 때, 잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물이 혼합됨으로써 유효성분들의 길항작용으로 인해 독립된 추출물의 세포 생존율에 비해 혼합추출물의 세포 생존율이 상당히 높았음을 확인할 수 있었다.

따라서 이하의 Western blot과 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)의 실험에서는 이전의 전자공여능, ABTS<sup>+</sup> radical 소거능 및 tyrosinase 저해활성 측정실험에서 가장 우수한 효능을 확인할 수 있었고, 멜라노마 세포의 생존율에 가장 영향을 미치지 않은 혼합추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도구간으로 설정하여 실험을 진행하였다.

**MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향 측정**

피부 및 뇌하수체를 포함한 여러 조직에서 분비되는 멜라닌 생성 유도 물질인 α-MSH는 미백 소재개발에서는 멜라닌 합성 유전자 발현을 전체적으로 조절하는 MITF 발현 저해나 멜라닌 생성을 억제하는 기전과 이미 생성된 멜라닌 분해를 촉진시키는 단계에서 작용하는 효소의 작용이 중요하며, 단백질

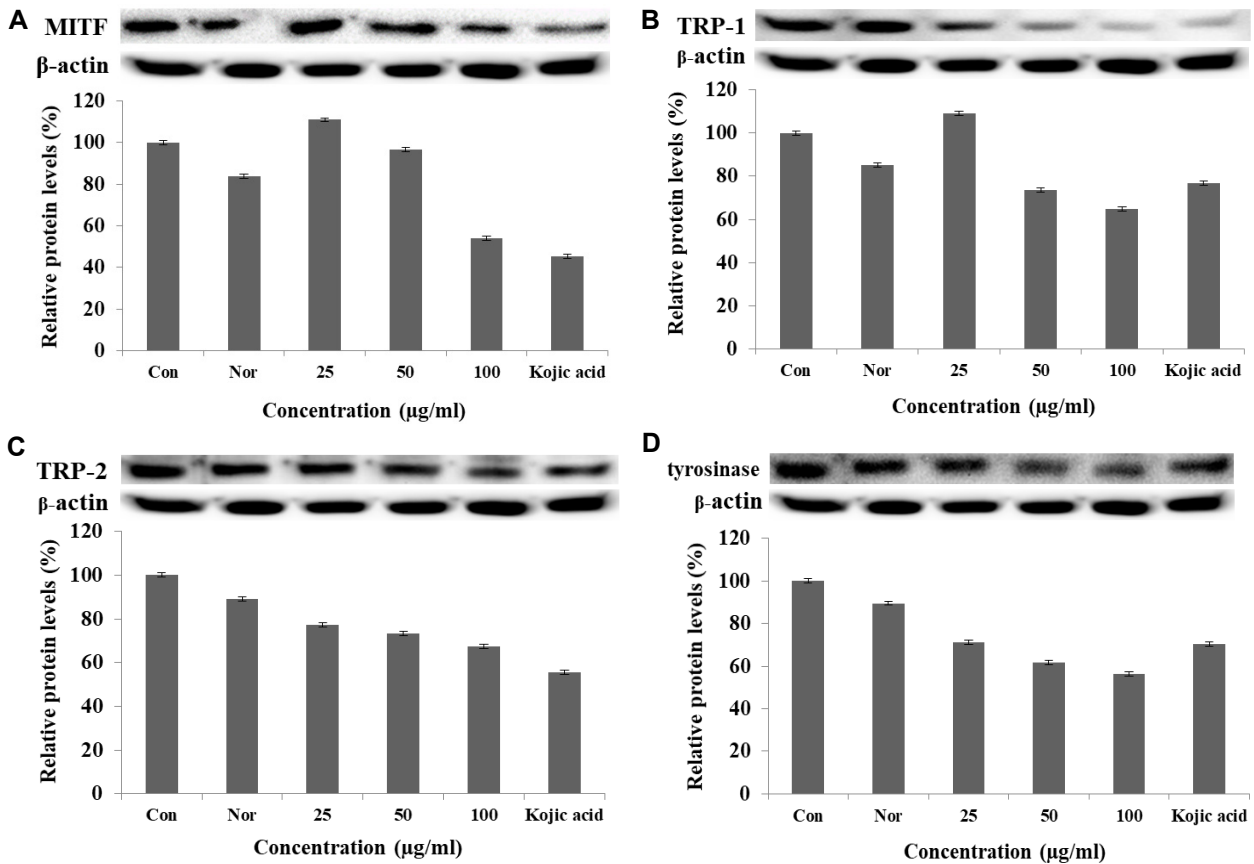


Fig. 5. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression rate of the mixed PKHC extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from A mixture of *Pinus koraiensis* and *Hibiscus cannabinus* L. extract in a ratio of 1:1 for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. Results are means ± S.D. of triplicate data.

발현과 연관성이 있는지 보기 위해 미백관련 전사인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase를 이용한 Western blot을 통해 관련 단백질 발현양의 변화를 확인하였다.

잣나무 목재와 케나프 줄기 추출물을 1:1의 비율로 혼합한 혼합추출물이 melanin 합성에 관계된 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Western blot을 통해 실험하였다. B16F10 mouse melanoma cell에 25, 50, 100 µg/ml의 혼합 추출물을 농도별로 처리한 후 control은 α-MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현시켰으며, normal은 α-MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이때 단백질 발현양을 비교하기 위하여 세포의 여러 종류나 조건에서도 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과, 혼합 추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도별로 처리한 B16F10 군에서 α-MSH에 의해 증가된 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 대조군 구로 사용된 kojic acid와 비교하였을 때 tyrosinase의 단백질 발현양에서 특히 유의한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

**MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향 측정**

RT-PCR을 통해 혼합 추출물이 melanin 합성에 관계된 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase에 미치는 mRNA 발현 억제 효과를 알아보기 위하여 mouse melanoma cell (B16 F10)에 25, 50, 100 µg/ml의 추출물을 농도별로 처리한 후 24 시간 뒤에 mRNA 발현량을 측정하여 Fig. 6과 같이 나타내었다. Control은 α-MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현시키고, normal은 α-MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. 그 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 혼합 추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 B16F10에서 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현이 추출물의 농도가 증가함에 따라서 억제됨을 확인하였으며 대조군인 kojic acid와 비교했을 때 특히 TRP-2와 tyrosinase에서 우수한 억제능을 확인할 수 있었다.

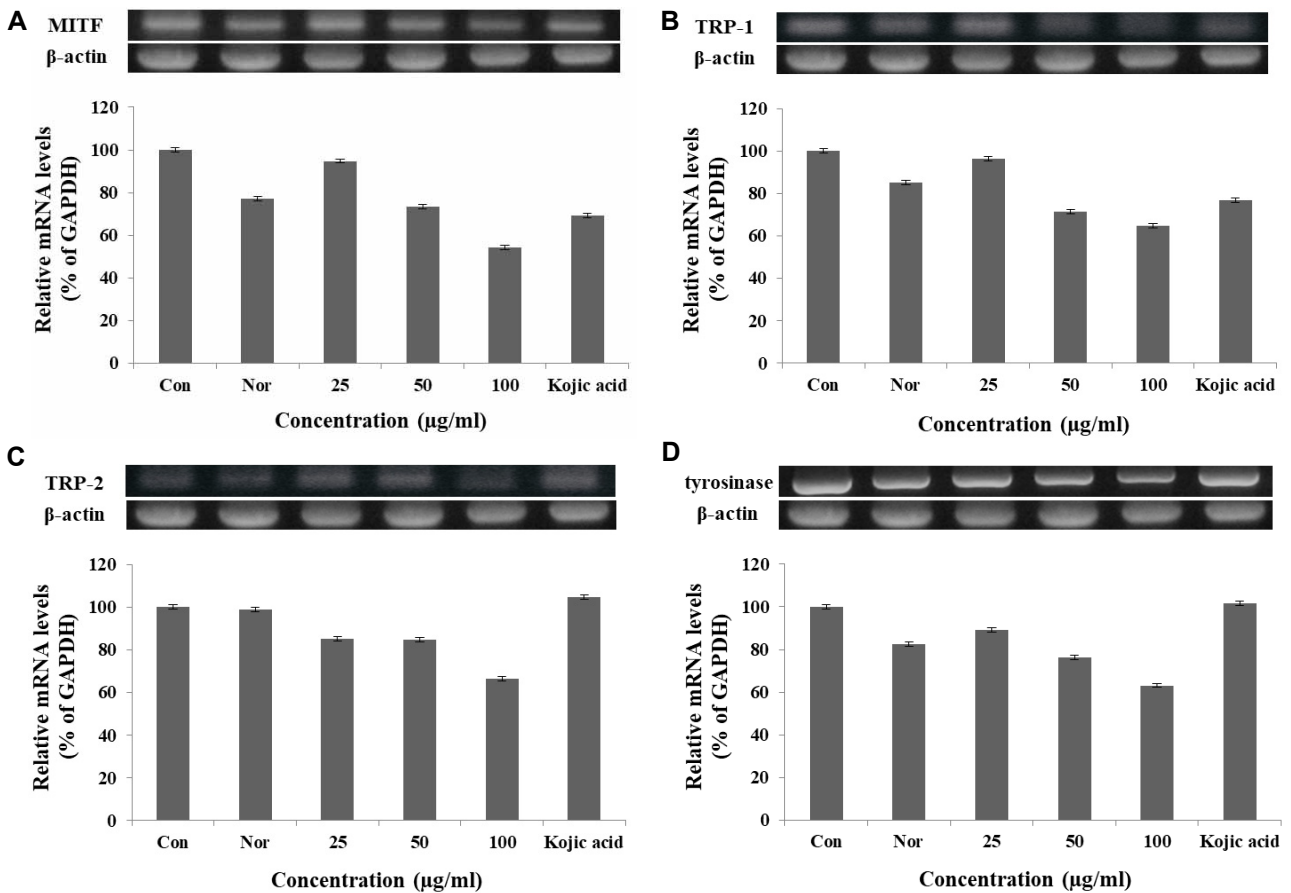


Fig. 6. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA expression rate of the mixed PKHC extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10<sup>6</sup> cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from A mixture of *Pinus koraiensis* and *Hibiscus cannabinus* L. extract in a ratio of 1:1 for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. Results are means ± S.D. of triplicate data.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nat. Kor. J. Oriental Physiol.* **26**, 1199-1120.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 237-242.
- Go, Y. J., Kim, Y. E., Kim, H. N., Lee, E. H., Cho, E. B., Sultanov, A., Kwon, S. L. and Cho, Y. J. 2020. Inhibition effect against elastase, collagenase, hyaluronidase and anti-oxidant activity of thinning Green ball apple. *J. Appl. Biol. Chem.* **63**, 43-50.
- Imokawa, G. and Mishima, Y. 1981. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. J. Dermatol.* **104**, 513-540.
- Iwata, M., Com, T., Iwata, S., Everett, M. A. and Fuller, B. B. 1990. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Investig. Dermatol.* **95**, 9-15.
- Jang, T. W. and Park, J. H. 2017. Antioxidative activities and whitening effects of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum*. *J. Life Sci.* **27**, 536-544.
- Jee, S. O. 2009. Antioxidant activities and whitening effect of the Mulberry (*Morus alba* L.) root bark extracts. *Kor. J. Plant Res.* **22**, 145-151.
- Kim, B. Y., Park, S. H., Park, B. J. and Kim, J. J. 2015. Whitening effect of *Androsace umbellata* extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **41**, 21-26.
- Kim, D. H., Moon, Y. S. and Son, J. H. 2015. Verification of anti-oxidative activity of *Aruncusdioicus*, a native plant of Ulleungdo. *J. Plant Biol.* **42**, 55-59.
- Kim, J. H., Seo, I. G. and Park, S. J. 2016. An analysis on the situation of collection and utilization of the trees damaged by Pine Wilt Disease. *J. Environ. Sci. Int.* **25**, 127-134.
- Kim, Y. E., Yang, J. W., Lee, C. H. and Kwon, E. K. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* sing. (Pine Mushroom). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 555-560.
- Lee, H. J., Choi, Y. J., Choi, D. H. and Hong, I. P. 2003. Extractives of *Pinus koraiensis* wood. *J. Kor. Wood Sci. Technol.* **31**, 49-55.
- Lee, J. Y., Velusamy, V., Koo, J. Y., Ha, B. K., Kim, D. S., Kim, J. B., Kim, S. H. and Kang, S. Y. 2012. Comparison of growth characteristics and chemical composition of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varieties as a potential forage crop. *Kor. J. Crop Sci.* **57**, 132-136.
- Lee, K. H., Cho, Y. L., Joo, C. G., Joo, Y. J., Kwon, S. S. and Park, C. 2011. Study on the anti-inflammatory effect of Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides isolated from *Hibiscus cannabinus* L. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **19**, 426-434.
- Lin, C. B., Babiarez, L., Liebel, F., Roydon-Price, E., Kizoulis, M., Gendimenico, G. J., Fisher, D. E. and Seiberg, M. 2002. Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 1330-1340.
- Park, W. H., Ko, D. W., Kwon, T. S., Nam, Y. W. and Kwon, Y. D. 2018. Analysis of pinewood nematode damage expansion in Gyeonggi Province based on monitoring data from 2008 to 2015. *J. Kor. Soc. For. Sci.* **107**, 486-496.
- Seo, E. J., Hong, E. S., Choi, M. H., Kim, K. S. and Lee, S. J. 2010. Antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts. *Kor. J. Food Sci. Tech.* **42**, 750-754.
- Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T. and Sawamura, M. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-[1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**, 206-209.
- Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.



## 초록 : 친환경 소재 잣나무 목재와 케나프 줄기 혼합물의 항산화 및 미백효과

오민정<sup>1</sup> · 염현지<sup>1</sup> · 채정우<sup>2</sup> · 이진영<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>호서대학교 화장품생명공학부, <sup>2</sup>경기도산림환경연구소)

본 연구는 친환경 소재인 잣나무 목재 추출물과 케나프 줄기 추출물의 항산화 및 미백 효능을 검증하고, 잣나무 목재 추출물과 케나프 줄기 추출물을 동일 비율로 혼합하였을 때 유효성분들의 상호작용을 확인하고자 하였다. 각각의 추출물을 1:1의 비율로 혼합한 추출물의 전자공여능 및 ABTS 소거능을 측정된 결과 1,000 µg/ml에서 추출물 성분들의 상승작용을 통해 혼합 추출물이 93.7%, 94%로 가장 높은 효능을 나타내었다. 잣나무 목재, 케나프 줄기 및 혼합 추출물의 tyrosinase 억제활성을 측정된 결과 1,000 µg/ml 농도에서 40%, 27.5%, 43%의 효과를 보였다. 따라서 추출물에 함유되어 있는 유효 성분들의 상승효과로 혼합 추출물의 높은 효능을 확인할 수 있었다. 잣나무 목재, 케나프 줄기 및 혼합 추출물의 melanoma cell에 대한 세포 독성 측정 결과 1,000 µg/ml 농도에서 각각 87.4%, 80.2%, 98%의 생존율을 나타내었으며, 결과적으로 혼합 추출물은 길항작용을 통해 같은 농도에서도 100%에 가까운 세포 생존율을 보였다. 잣나무 목재와 케나프 줄기 혼합 추출물의 Western blot에 의한 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현 효과를 측정된 결과, 100 µg/ml 농도에서 53.9%, 64.8%, 67.3%, 56.1%로 단백질 발현 억제 효과를 보였다. 또한 RT-PCR을 통해 혼합 추출물이 미백관련 인자들의 mRNA 발현에 미치는 억제효과를 측정된 결과 100 µg/ml 농도에서 각각 54.4%, 64.9%, 66.6%, 63.1%로 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 그 결과 잣나무 목재와 케나프 줄기를 1:1 비율로 혼합한 추출물의 항산화 및 미백 효능을 검증하였으며, 본 연구결과를 종합하였을 때 잣나무 목재와 케나프 줄기를 혼합한 추출물이 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.